

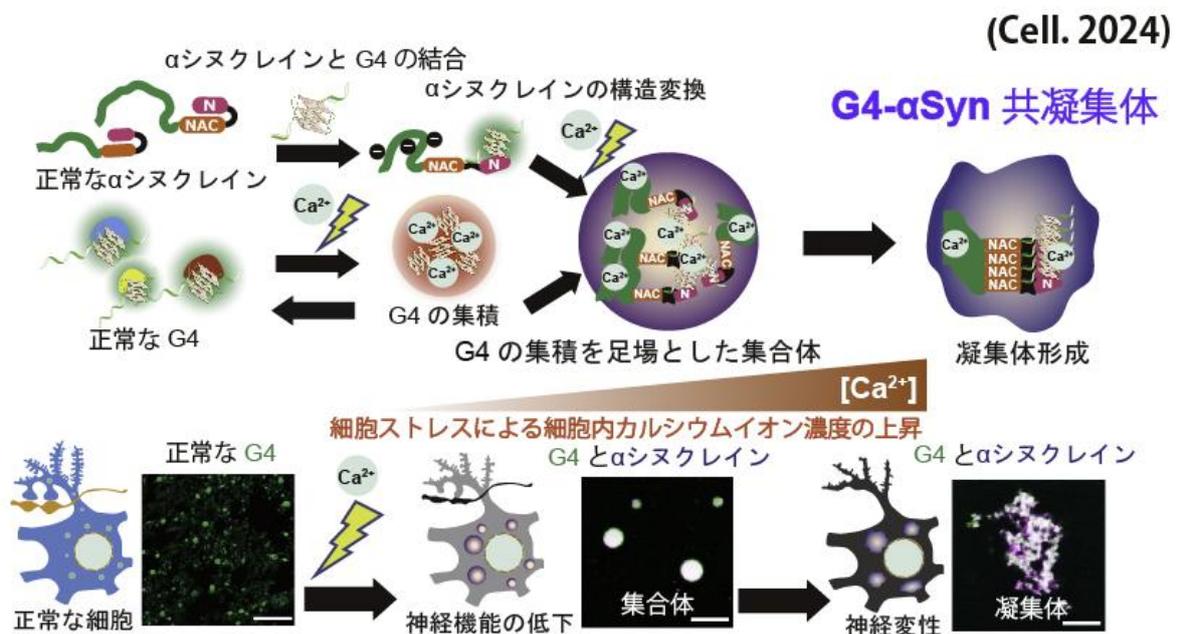
RNA 高次構造によるプリオノイド機構の解明

熊本大学 発生医学研究所
塩田 倫史

【研究の概要】

社会の高齢化に伴い神経変性疾患の患者は急速に増加しており、その対策が急務である。代表的な神経変性疾患であるタウオパチー（アルツハイマー病など）やシヌクレイノパチー（パーキンソン病、レビー小体型認知症など）は、神経細胞内にタウや α シヌクレイン（ α Syn）が「プリオン性（プリオノイド）」に凝集・細胞内蓄積・細胞間伝播することで神経細胞の機能低下を引き起こし、認知障害や運動障害などの症状を呈する。特に、シヌクレイノパチーの代表例であるパーキンソン病はアルツハイマー病に次いで頻度の高い神経変性疾患であり、その有病率は10万人あたり100から180人とされている。シヌクレイノパチーは、ふるえ・こわばり・動きが鈍くなるといったパーキンソン症状、認知症、自律神経機能障害、睡眠障害など多彩な症状を伴う進行性の難病であるが現在の治療法は対症療法のみであり、創薬開発に資する新しい科学的エビデンスに基づく根治薬が求められている。

これまで、シヌクレイノパチーの原因となる「 α Syn の凝集メカニズム」は未解明であった。研究代表者は、G4RNA が α Syn 凝集の足場を形成し、神経変性に寄与することを示した。精製 α Syn は G4RNA に直接結合した。G4RNA が Ca^{2+} 依存的に相分離による自己会合を引き起こし、 α Syn のゾル-ゲル相転移を促進することを明らかにした。細胞間伝播能を持つ α Syn フィブリル（PFF）を処置した神経細胞では、細胞ストレスにより細胞質への持続的な Ca^{2+} 過剰流入が観察され、G4RNA を形成するシナプス関連 mRNA の会合体が α Syn と共凝集し、シナプス機能障害を引き起こした。in vivo において光遺伝学的アプローチにより G4RNA を青色光照射により人為的に会合させることで、 α Syn の凝集、神経細胞の機能障害、及び進行性の神経変性が引き起こされた。また、G4RNA に結合しその構造を展開するプロトポルフィリン IX は、G4RNA の相分離を抑制した。さらに、プロトポルフィリン IX のプロドラッグである 5-アミノレブリン酸をシヌクレイノパチーモデルマウスへ経口投与したところ、神経変性と進行性運動障害が抑制された。これらのことから、細胞内 Ca^{2+} ホメオスタシスの調節障害による G4RNA の会合が、 α Syn のゾル-ゲル相転移とそれに続く凝集を促進し、シヌクレイノパチーの病態発症に関与することが示された（下図；Cell. 2024）。



【研究の詳細】

1) α Syn は G4RNA に直接結合しゾル-ゲル相転移する

まず、ヒト α Syn PFF を処置したマウス大脳皮質培養神経細胞を用いて、内在性 α Syn 凝集の時間的変化を解析した。未処置のコントロール細胞において、内在性 α Syn はシナプトフィジン陽性のプレシナプスと共局在した。一方、PFF 処置後において、内在性 α Syn は細胞質で顆粒を形成した。 α Syn 凝集体の特徴であるリン酸化 α Syn (pS129) の免疫反応性は時間依存的に増加し、PFF 処置 8 日後に顕著であった。PFF 処理 4 日後において、 α Syn 顆粒は主に Dcp1a 陽性 P-body と共局在していたが (43.0%)、FMRP 陽性 RNA 顆粒 (3.2%) や p62 陽性アグリソーム (18.9%) とはほとんど共局在していなかった。一方、PFF 処理 8 日後には、 α Syn 顆粒は主にアグリソーム (43.9%) に局在し、P-body (6.1%) や RNA 顆粒 (3.1%) にはほとんど局在しなかった。ストレス顆粒は PFF 処置条件では観察されなかったため、ストレス顆粒形成のために代わりに亜ヒ酸ナトリウムを処置した。亜ヒ酸ナトリウム処置後、細胞質には HuR 陽性ストレス顆粒と α Syn 顆粒の両方が検出されたが、両者は全く共局在しなかった。

PFF 処置による細胞内での α Syn の動態を検討するために、GFP- α Syn を過剰発現した HEK293 細胞を用いた。PFF 処置 24 時間後の FRAP アッセイにおいて、GFP- α Syn 顆粒は急速な蛍光回復動態を示し、pS129 や p62 と共局在しなかった。しかしながら、PFF 処置 48 時間後には GFP- α Syn 顆粒の蛍光回復は著しく減少し、pS129 および p62 と共局在した。これらの結果から、 α Syn は LLPS を介して RNA/タンパク質複合体 (RNPs) と一過性に顆粒を形成し、その後アグリソーム凝集体を形成することが示唆された。

続いて RNA やタンパク質が *in vitro* で α Syn のゾル-ゲル相転移を誘導するか検討した。精製 α Syn は、分子クラウディング剤であるポリエチレングリコール (PEG) の濃度に正相関して LLPS による液滴を形成するが、PEG 無添加では液滴は観察されなかった。また、Neuro-2a 細胞から抽出したトータル RNA を添加し、RNA が α Syn の LLPS による液滴形成に影響を与えるか検討した。結果として、RNA 添加により α Syn の液滴形成に必要な PEG 濃度が減少するとともに、液滴からゲル状態への相転移が見られた。mCherry- α Syn を用いた蛍光イメージングにより、これらのゲル状凝集体が α Syn を含むことが確認された。50 ng/ μ L RNA 存在下での FRAP 実験では、PEG 無添加の α Syn の蛍光回復は観察されたが、PEG20% の α Syn は蛍光回復が観察されなかった。同様の実験を Neuro-2a 細胞から抽出したヌクレアーゼ処理済タンパク質で行ったところ、 α Syn 液滴は PEG 存在下で形成されたが、ゲル状態への相転移は起こらなかった。

次に、精製 α Syn とランダム配列の RNA オリゴヌクレオチド (24nt) を用いて、*in vitro* RNA Bind-n-Seq を行った。 α Syn に結合する RNA 配列のトップ 10 は、グアニンに富んだ配列であった。 α Syn の濃度を変えて数回実施した結果、これらの配列はランダムではなく、連続したグアニンであることが明らかになり、G4RNA が α Syn に結合することが示唆された。 α Syn が G4RNA と優先的に直接相互作用することを確認するために、様々な RNA 構造を用いて EMSA を行った。結果として、 α Syn は G4RNA (G4tr; TERRA) に対してのみ高い親和性を示し、他の RNA 構造には親和性を示さなかった。定量的表面プラズモン共鳴 (SPR) 結合解析では、 α Syn は G4RNA (G4tr; $KD = 3.63 \pm 0.63 \mu M$) において変異体 (G4mt; $KD = n.d.$) と比較し高い選択性を示した。 α Syn 液滴に対する G4RNA の添加は、 α Syn のゲル状態への相転移を引き起こし、それらはプロテオスタット陽性の凝集体であることが確認された。

2) α Syn の凝集には Ca^{2+} による G4RNA の会合が必須である

G4RNA は *in vitro* で LLPS による液滴形成を起こす性質があり、これは 2 価の陽イオンによって静電的に増強されることが明らかになっている。実際に、G4RNA は PEG 無添加で LLPS による液滴が観察され、 Ca^{2+} 添加により液滴のサイズが増大した。また、 Ca^{2+} による液滴サイズの増大は、 Ca^{2+} キレーターである EGTA の添加により抑制された。さらに、G4RNA 液滴は Ca^{2+} 存在下で α Syn と共凝集した。G4RNA 非存在下では、 Ca^{2+} の有無にかかわらず、 α Syn 液滴やゲル状凝集体は観察されなかった。 Ca^{2+} は G4RNA/ α Syn 複合体をゾル-ゲル相転移し FRAP を有意に減少させたが、EGTA を加えることでゾル-ゲル相転移が抑制された。また、プロテオスタットの蛍光シグナルは、 Ca^{2+} 存在下の G4RNA/ α Syn 複合体でのみ検出された。これらの結果から、 α Syn の凝集には、 Ca^{2+} による G4RNA の会合が必要であることが示唆された。

細胞ストレス条件において、神経細胞内に持続的に過剰な Ca^{2+} が流入することは神経変性の主要因であることが知られている。実際、PFF による細胞ストレスに応答して、培養神経細胞では細胞内 Ca^{2+} 濃度の過剰な上昇がみられた。そこで、G4 特異的抗体 BG4 を用いた免疫染色により、 Ca^{2+} による G4RNA の会合が神経細胞で観察されるか検討した。PFF および Ca^{2+} イオノフォア (イオノマイシン) 処置により、無処置のコントロール細胞と比較して、細胞質 G4 顆粒の数が小サイズ (0.05-0.2 μm^2) および大サイズ (>0.2 μm^2) の両方で有意に増加した。さらに、 α Syn と共局在する G4 顆粒の数は、PFF 処理後に有意に増加した。PFF 処理 8 日後、マウス培養神経細胞では pS129 陽性凝集体が G4 顆粒と共局在した。PFF を線条体背部に注射し内在性 α Syn をプリオン様に脳内伝播させるシヌクレイノパチーモデルマウスでは、黒質のチロシン水酸化酵素 (TH) 陽性ドパミン作動性神経細胞に pS129 陽性凝集体が観察され G4 顆粒と共局在した。さらに、パーキンソン患者のヒト死後脳では、pS129 陽性凝集体の大部分 (90%以上) が G4 顆粒と共局在した。

3) α Syn は G4RNA 形成シナプス mRNA と共凝集する

神経細胞における α Syn 凝集の足場となる G4RNA 形成 mRNA を同定するため、PFF を処置したマウス培養神経細胞において、BG4 結合 RNA を RIP-seq で解析した。その結果、コントロールおよび PFF 処置神経細胞でそれぞれ 254, 524 の mRNA が同定され、そのうち 162 は共通分子であった (カットオフ値: P 値 < 0.05 、fold-change > 1.5)。GO 解析では、PFF 投与神経細胞から得られた BG4 結合 RNA は神経変性に寄与しており、これらの RNA の多くはシナプス形成に関連するものであった。本研究では、PFF 処置神経細胞で検出された G4RNA の中で、シナプス形成に重要なタンパク質 (CaMKII, PSD95) をコードする mRNA、*Camk2a* と *dlg4* に注目した。*Camk2a* と *dlg4* の G4RNA は、*in vitro* において Ca^{2+} 存在下 α Syn と共凝集し、プロテオスタット陽性の凝集体を形成した。PFF 処理 8 日後のマウス大脳皮質培養神経細胞で、免疫染色および *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。その結果、これらの mRNA は細胞質の pS129 陽性凝集体と共局在性を示した。

4) オプトジェネティクスによる G4RNA の会合は α Syn の凝集と神経機能障害を引き起こす

G4RNA の会合が α Syn の凝集の足場となることを検討するために、青色光刺激による時空間制御下で G4RNA の会合を誘導する「OptoG4 システム」を開発した。OptoG4 を発現させた Neuro-2a 細胞では、青色光刺激時間依存的に MCP-Cry2 クラスタが形成された。OptoG4 と α Syn の共発現細胞では、青色光刺激 3 時間後に MCP-Cry2 クラスタが α Syn および G4-MS2 RNA と共局在した。

OptoG4 を発現したマウス大脳皮質培養神経細胞では、内在性 α Syn が 3 時間の青色光刺激後に pS129 陽性および p62 陽性の凝集体を形成した。OptoG4 によって誘導された α Syn 凝集が神経細胞活動に及ぼす影響を調べるため、自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) を測定した。青色光刺激を受けた OptoG4 発現神経細胞では、光刺激を受けていない OptoG4 発現神経細胞と比較し sEPSC の振幅と頻度が有意に減少した。OptoG4 システムのネガティブコントロールとして、G4RNA を形成しない (UUACCG)₂₃ 反復からなる G4mt-MS2 RNA を用いた「OptoG4mt システム」を作製した。MCP-Cry2 単独または OptoG4mt を発現した神経細胞では、青色光刺激有無にかかわらず、神経活動の変化は観察されなかった。

次に、OptoG4 システムを *in vivo* 実験に導入し、マウス黒質ドパミン神経細胞に以下の組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) を注入した (AAV-mTH-iCre、AAV-MCP-Cry2、AAV-G4-MS2)。AAV 投与の 14 日後、マウス脳にワイヤレス光刺激装置を埋め込み、黒質で青色光刺激を可能にした。移植の 2 日後、マウスに 1 日 1 時間の青色光刺激を 4 週間行った。ドパミン神経細胞における免疫組織化学的解析により、OptoG4 発現マウスでは、青色光刺激により α Syn 顆粒が形成され、MCP-Cry2 および G4-MS2 RNA と共凝集した。青色光刺激した OptoG4 マウスでは、TH 陽性ドパミン神経細胞の数は光刺激を受けていないマウスと比較し有意に減少し、pS129 陽性凝集体が観察された。ロータロッド試験とビームウォーキング試験を行い、青色光刺激した OptoG4 マウスは、光刺激を受けていないマウスと比較し有意な運動機能障害が観察された。

5) 5-ALA 投与はシヌクレイノパチーモデルマウスの運動機能障害を抑制する

研究代表者は、生体内に存在するプロトポルフィリン IX (PPIX) が G4RNA に結合し、G4 構造を展開することを以前見出している。そこで PPIX が G4RNA の LLPS による会合に影響を及ぼすか *in vitro* で検討した。PPIX 処置により、G4RNA 液滴のサイズが有意に縮小した。さらに、G4RNA と α Syn からなるゲル状凝集体の形成も PPIX によって阻害された。mCherry- α Syn 発現 Neuro-2a 細胞に PPIX のプロドラッグである 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を投与すると、PFF 処置 24 時間後の G4 顆粒の増加と α Syn の凝集が有意に抑制された。PFF 処置培養神経細胞において、5-ALA は 8 日後の sEPSC の振幅と頻度の減少を有意に抑制した。また、5-ALA は pS129 陽性凝集体を減少させ、PFF 処置培養神経細胞における *Dlg4* および *Camk2a* の mRNA レベルに変化を与えることなく、PSD95 および CaMKII α タンパク質レベルの減少を抑制した。次に、PFF 処置 α Syn 伝播シヌクレイノパチーモデルマウスを用いて、 α Syn の凝集と運動機能障害に対する 5-ALA の効果を *in vivo* で検討した。PFF をマウス線条体に投与後、5-ALA (1 または 3mg/kg/日) を経口投与した。PFF 投与から 2 ヶ月後、5-ALA (3 mg/kg) はシヌクレイノパチーモデルマウスの運動機能障害を有意に抑制した。さらに、5-ALA は pS129 陽性凝集体の形成と黒質ドパミン神経細胞の変性を有意に抑制した。